7 月 July
2019，62(7)：823 – 829
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http：//www. insect. org. cn
doi：10. 16380/j. kcxb. 2019. 07. 005

灰飞虱内生病毒 HiPV 外壳蛋白 VP1 多克隆抗体的制备及在病毒检测中的应用

朴　君[1,#]，许春玲[1,2,#]，朴敬爱[1]，周益军[2]，李　硕[2,*]

（1. 辽宁师范大学生命科学学院，辽宁大连 116081；2. 江苏省农业科学院植物保护研究所，南京 210014）

摘要：【目的】前期发现水稻条纹病毒(rice stripe virus，RSV)可与介体灰飞虱 *Laodelphax striatellus* 体内的 HiPV 病毒(Himetobi P virus，HiPV)互作。本研究旨在制备 HiPV 外壳蛋白 VP1 的多克隆抗体，并评估其在 HiPV 病毒检测中的可用性，以为深入研究 HiPV-RSV 和 HiPV-灰飞虱的互作机制提供技术支持。【方法】以 RT-PCR 方法从灰飞虱成虫体内扩增 HiPV 主要外壳蛋白基因 *VP*1，然后将 *VP*1 基因亚克隆至原核表达载体 pET-32a 中，构建表达载体 pET-*VP*1。将重组质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21（DE3），经 IPTG 诱导、Ni^{2+}-NTA 亲和层析纯化，获得重组蛋白，免疫新西兰大白兔，制备抗体。【结果】从灰飞虱体内克隆到 774 bp 的 HiPV 外壳蛋白基因 *VP*1，经原核表达、纯化，获得分子量约 47.5 kD 的融合蛋白，免疫新西兰大白兔后获得 VP1 多克隆抗体。该抗体间接 ELISA 效价达 1∶819 200，与 HiPV 外壳蛋白 VP1 有特异性反应，而与灰飞虱蛋白无交叉反应。利用该多克隆抗体建立了检测单头灰飞虱成虫体内 HiPV 的 Western blot 和免疫捕获 RT-PCR 方法，检测结果显示 HiPV 在携带和不携带 RSV 的灰飞虱高亲和性群体内均广泛存在。【结论】利用制备的 HiPV 的 VP1 多克隆抗体可特异性检测灰飞虱体内 HiPV。本研究为 HiPV 病毒的快速检测以及 HiPV-RSV 互作、HiPV-灰飞虱互作研究提供了技术支持。

关键词：灰飞虱；HiPV 病毒；*VP*1 基因；原核表达；多克隆抗体；病毒检测

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2019)07-0823-07

Preparation of the polyclonal antibody of capsid protein VP1 of Himetobi P virus in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae) and its application in the virus detection

PIAO Jun[1,#], XU Chun-Ling[1,2,#], PIAO Jing-Ai[1], ZHOU Yi-Jun[2], LI Shuo[2,*] (1. School of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116081, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: 【Aim】In our previous work, the interaction between rice stripe virus (RSV) and Himetobi P virus (HiPV) of the small brown planthopper (SBPH), *Laodelphax striatellus*, was found. This study aims to prepare the polyclonal antibody (PAb) of the capsid protein VP1 of HiPV and to assess its application in the detection of HiPV, so as to provide a technical basis for further studying the interaction of HiPV-RSV and HiPV-SBPH. 【Methods】*VP*1 gene of HiPV was amplified from SBPH adult via RT-PCR, and subcloned into the prokaryotic expression vector pET-32a to construct the vector pET-*VP*1.

基金项目：国家自然科学基金项目(31601611，31470256)

作者简介：朴君，男，朝鲜族，1970 年 12 月生，吉林延吉人，博士，副教授，研究方向为动物学，E-mail：piaojun1188@163. com；许春玲，女，1995 年 2 月生，内蒙古赤峰人，硕士研究生，研究方向为植物病毒与昆虫介体互作，E-mail：xcl950220@163. com

[#]共同第一作者 Authors with equal contribution

[*]通讯作者 Corresponding author，E-mail：lishuo@jaas. ac. cn

收稿日期 Received：2019-01-19；接受日期 Accepted：2019-03-12

The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3), and the recombinant protein was obtained by IPTG induction and purified by Ni^{2+}-NTA affinity chromatography. The antibody was prepared by immunizing New Zealand white rabbit with the purified recombinant protein. 【Results】 A 774 bp product of capsid protein gene *VP*1 of HiPV was amplified from SBPH, and a 47.5 kD VP1 fusion protein was obtained through prokaryotic expression and purification. The purified VP1 recombinant protein was used to immunize New Zealand white rabbit, and the PAb was prepared. The titer of PAb was 1∶819 200 in indirect ELISA, and the PAb could react specifically with HiPV VP1 but not with SBPH proteins. Using PAb against HiPV, methods of Western blot and immunocapture-RT-PCR (IC-RT-PCR) for the detection of HiPV in single adult of SBPH were established. The detection results showed that HiPV was prevalent in the RSV-infected and uninfected SBPH high-affinity populations. 【Conclusion】 HiPV can be detected specifically in SBPH using the prepared VP1 polyclonal antibody. This study provides a technical support for the rapid detection of HiPV and the study of HiPV-RSV and HiPV-SBPH interaction.

Key words: *Laodelphax striatellus*; Himetobi P virus; *VP*1 gene; prokaryotic expression; polyclonal antibody; virus detection

灰飞虱 *Laodelphax striatellus* (small brown planthopper, SBPH)是重要的农业害虫,主要危害水稻、玉米等作物。除以刺吸方式直接危害作物外,灰飞虱还是多种作物病毒病的重要传播介体,它可以传播水稻条纹病毒(rice stripe virus, RSV)引起的条纹叶枯病,传播水稻黑条矮缩病毒(rice black-streaked dwarf virus, RBSDV)引起的水稻黑条矮缩病、玉米粗缩病和小麦绿矮病(Fang *et al.*, 2001),传播小麦丛矮病毒(wheat rosette stunt virus, WRSV)引起的小麦丛矮病(龚祖埙等, 1985)等,均对粮食生产造成严重威胁。因此,研究灰飞虱对病毒的特异性识别和传播机制,对于控制病毒病具有重要意义。

在长期进化过程中,病毒与其昆虫介体形成了复杂而多样的互作关系,其中,昆虫体内共生微生物可对介体传播病毒产生重要的影响(Wei and Li, 2016)。蚜虫和烟粉虱 *Bemisia tabaci* 内共生菌 *Buchnera* 产生的分子伴侣 GroEL 对病毒粒子在血淋巴中的稳定起着重要的保护作用(van den Heuvel *et al.*, 1997; Morin *et al.*, 1999)。黑尾叶蝉 *Nephotettix cincticeps* 内共生菌 *Sulcia* 的外膜蛋白(OMP)可以与水稻矮缩病毒(rice dwarf virus, RDV)互作,这使得 RDV 可以利用 *Sulcia* 古老的入卵途径侵入叶蝉卵母细胞,实现经卵传播(Jia *et al.*, 2017),此外,内共生菌 *Nasuia* 对于 RDV 的经卵传播也有贡献。沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 感染埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 后,增强了蚊子对登革热病毒和寨卡病毒的抵抗力,抑制了传毒效率(Bian *et al.*, 2010; Dutra *et al.*, 2016)。目前,还没有内共生细菌影响灰飞虱传毒的相关报道。Li 等(2017)以高通量测序方法分析了无毒、携带 RSV 和 RBSDV 灰飞虱群体的内共生细菌群落,发现病毒侵染并不显著改变灰飞虱体内细菌群落的组成,*Wolbachia* 是灰飞虱体内最主要的细菌。先前研究报道,灰飞虱体内 *Wolbachia* 感染与携带 RSV 无明显相关性,二者经卵传播过程也无显著相关性(乐文静等, 2011)。

HiPV 病毒(Himetobi P virus, HiPV)属于双顺反子病毒科(*Dicistroviridae*)蟋蟀麻痹病毒属 *Cripavirus*,是存在于稻飞虱体内的一种低致病性、持续感染性病毒,褐飞虱 *Nilaparvata lugens*、灰飞虱和白背飞虱 *Sogatella furcifera* 体内均有感染(Guy *et al.*, 1992)。HiPV 是正单链 RNA 病毒,基因组全长为 9 275 bp,包含两个大的开放阅读框(Nakashima *et al.*, 1999)。该病毒最早由日本研究人员发现报道,灰飞虱成虫和若虫均可感染,感染后无明显症状(Guy *et al.*, 1992)。电镜观察显示,灰飞虱中肠、后肠和马氏管中有大量病毒颗粒聚集,生殖器官、卵和唾液腺中未检测到 HiPV(Suzuki *et al.*, 1993)。

在研究 RSV 与灰飞虱互作过程中,作者实验室发现 RSV 核衣壳蛋白 NCP 与 HiPV 外壳蛋白 VP1 存在较强的互作关系,并进一步证实 VP1 蛋白可促进 RSV 在昆虫体内的增殖(Li *et al.*, 2015),但详细机制仍不清楚。为进一步研究 HiPV VP1 蛋白在 RSV 与 HiPV 互作中的功能,本研究利用原核表达系统表达了 VP1 蛋白,并制备抗血清,应用该多克隆抗体建立了检测单头灰飞虱成虫中 HiPV 的

Western blot 方法和免疫捕获 RT-PCR 方法。本研究为病毒的快速检测以及 HiPV-RSV 互作、HiPV-灰飞虱互作研究提供了技术支持。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

供试昆虫灰飞虱群体采集自江苏省海安县，由江苏省农业科学院植物保护研究所植物病毒研究室经多代筛选获得高亲和性带毒（RSV）群体和高亲和性无毒群体，两种群体在实验室常年维持。高亲和性群体参照刘海建等（2007）的方法筛选获得。

1.2　生化试剂、载体及菌株

Pfu DNA 聚合酶、限制性内切酶、Trizol 试剂和 pMD18-T 克隆载体购自 TaKaRa 公司；Ni^{2+}-NTA Agarose 亲和层析柱填料购自 Merck 公司；MuLV 逆转录酶购自 Promega 公司；原核表达载体 pET-32a 为 Novagen 公司产品；大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α 和 BL21（DE3）菌株由本实验室保存；免疫用兔为新西兰大白兔，由江苏省农业科学院实验动物中心提供；氟氏完全佐剂和不完全佐剂购自 Sigma 公司；其余试剂为国产分析纯。

1.3　HiPV 基因组结构分析及主要外壳蛋白 VP1 基因的克隆

根据 GenBank 中灰飞虱（GenBank 登录号：AB017037）和褐飞虱（GenBank 登录号：AB183472）来源的 HiPV 基因组全序列信息及相关报道（Nakashima *et al*.，1999），进行生物信息学分析，确定病毒两个大的开放阅读框，绘制其基因组结构图。明确 *VP*1 基因位置，设计特异引物，vp1-F：5′-A<u>GGATCC</u>GCTAACTTTGCGTCTACT-3′（下划线为 *Bam*HⅠ酶切位点）和 vp1-R：5′-C<u>GTCGAC</u>TAAACTTTGTCAAAGG-3′（下划线为 *Sal*Ⅰ酶切位点）。用 Trizol 提取 1.1 节灰飞虱高亲和性带毒群体总 RNA，利用 MuLV 逆转录酶和 Oligo（dT_{18}）反转录为 cDNA 第 1 链后，进行 PCR 扩增。PCR 反应体系：cDNA 1 μL，引物 vp1-F/vp1-R（10 μmol/L）各 2 μL，10 × *Pfu* Buffer 5 μL，dNTPs（10 mmol/L）1 μL，*Pfu* 酶（5 U/μL）1 μL，ddH_2O 补至 50 μL。PCR 反应条件：94℃ 5 min；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 40 s，34 循环；72℃ 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析，回收目的基因片段并与 pMD18-T 载体连接，转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞。挑取阳性单菌落测序，验证克隆载体中 *VP*1 基因的正确性，测序由上海英骏生物技术公司完成。经序列比对分析，正确的克隆命名为 pMD18-T-*VP*1。

1.4　VP1 的表达载体构建、原核表达和蛋白纯化

将 1.3 节构建的 pMD18-T-*VP*1 经 *Bam*HⅠ/*Sal*Ⅰ双酶切后，*VP*1 片段亚克隆入原核表达载体 pET-32a 中，获得重组质粒 pET-*VP*1，测序确认没有移码突变。将 pET-*VP*1 转化到大肠杆菌 BL21（DE3）中，28℃下 IPTG（终浓度 0.5 mmol/L）诱导 4 h。表达产物经 Ni^{2+}-NTA Agarose 亲和层析柱纯化。12.5% SDS-PAGE 电泳分析表达产物和纯化蛋白，并用 6 × His 单抗进行 Western blot 分析。

1.5　重组蛋白的多克隆抗体制备及效价测定

将 1.4 节纯化的 VP1 融合蛋白经 PBS 透析过夜复性，免疫新西兰大白兔。选取健康雄兔 1 只，免疫前于耳缘静脉取少量血作为对照血清。连续免疫 6 次，每周 1 次，每次免疫量为 0.5 mg。前 3 次免疫采用皮下多点注射，第 1 次将 VP1 蛋白与等体积氟氏完全佐剂乳化后注射，第 2 和 3 次将蛋白与等体积氟氏不完全佐剂乳化后注射，后 3 次采用静脉注射法免疫，不加佐剂，直接注射抗原。最后一次免疫 10 d 后，用心脏采血法采血，4℃斜面放置过夜，吸取血清，8 000 r/min 离心 10 min，上清即为 VP1 抗血清。加入 NaN_3 后，－20℃保存备用。参照 Jiang 等（2003）的方法采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价。

1.6　Western blot 方法检测单头灰飞虱成虫体内 HiPV

为检测 1.5 节制备的 VP1 多克隆抗体的特异性，选取 30 头灰飞虱成虫提取总蛋白，12.5% SDS-PAGE 电泳后，用 VP1 多抗进行 Western blot 分析，未感染 HiPV 灰飞虱成虫总蛋白作为对照。为进行单头昆虫病毒检测，将单头灰飞虱成虫放入 0.2 mL 离心管中，加入 100 μL 0.05 mol/L 碳酸盐包被缓冲液（pH 9.6），用牙签捣碎匀浆，离心，取上清加入 200 μL 预冷的丙酮沉淀蛋白，加 10 μL 8 mol/L 尿素溶解沉淀，即为单头灰飞虱成虫总蛋白。将单头灰飞虱成虫总蛋白全部上样进行蛋白电泳，用 VP1 多抗进行 Western blot 检测 HiPV。随机抽取 1.1 节中两个群体中 80 头成虫进行验证。

1.7　免疫捕获反转录 PCR（IC-RT-PCR）检测单头灰飞虱成虫体内 HiPV

参照尚海丽等（2010）的方法，利用 VP1 多克隆抗体建立检测单头灰飞虱成虫中 HiPV 的 IC-RT-PCR 方法。VP1 多抗用 PBS 按 1∶1 000 比例（v/v）

稀释,取 50 μL 包被 PCR 管,4℃孵育过夜。弃包被液用 PBS 洗涤 3~4 次,加入 50 μL 灰飞虱成虫研磨液(单头灰飞虱成虫以 100 μL PBS 匀浆),37℃孵育 2 h 后,PBS 洗涤 3 次,灭菌去离子水洗涤 1 次,离心后吸尽管底余液,直接在 PCR 管中配制反转录体系:DEPC 水 6.7 μL, 5×RT Buffer 6 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 12 μL, DTT(100 mmol/L) 1 μL, 下游引物 vp1-R(引物序列同 1.3 节, 10 μmol/L) 3 μL,混匀后 94℃水浴变性 4 min,迅速冰浴 3 min,再往管中加入 MuLV 逆转录酶(200 U/μL) 1 μL 和 RNase Inhibitor(50 U/μL) 0.3 μL,反应总体积 30 μL,42℃反转录 1 h。取 3 μL 反转录产物作模板,用 vp1-F/vp1-R 引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系:反转录产物 3 μL, 引物 vp1-F/vp1-R(同 1.3 节, 10 μmol/L)各 1 μL, 10×Taq Buffer 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.4 μL, ddH_2O 补至 20 μL。PCR 反应条件同 1.3 节。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,并测序验证检测结果。

2 结果

2.1 HiPV 主要外壳蛋白 VP1 基因的克隆和序列分析

经序列比对和分析,确定 HiPV 基因组结构(图 1)。病毒基因组全长为 9 275 bp,5′末端共价结合 VPg,3′末端带有 Poly(A)尾巴,包含两个大的开放阅读框(ORF)。第 1 个 ORF 编码病毒复制相关的解螺旋酶(helicase)、蛋白酶(protease)和 RNA 聚合酶(RNA polymerase);第 2 个 ORF 包含 3 个主要的外壳蛋白即 VP1, VP2 和 VP3,其中 VP1 基因位点 8 324~9 097 bp,蛋白分子量 28.5 kD;VP2 基因位点 6 473~7 258 bp,蛋白分子量为 36.5 kD;VP3 基因位点 7 463~8 323 bp,蛋白分子量为 33.0 kD。VP4 为 VP3 蛋白前体,基因位点 7 259~8 323 bp,蛋白分子量为 41.5 kD,经切割等加工修饰后,产生 VP3。

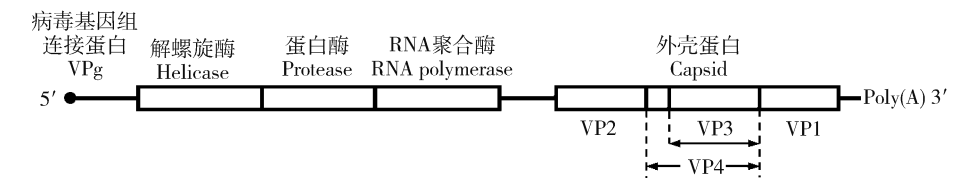


图 1 HiPV 基因组结构

Fig. 1 Genome organization of HiPV

VPg: 病毒基因组连接蛋白 Viral genome-linked protein. 白色小框表示病毒 RNA 链上编码蛋白的 ORF。ORFs are displayed as white boxes on viral-sense RNA.

以灰飞虱总 RNA 为模板,用特异引物经 RT-PCR 扩增出一条符合目的基因大小的特异条带,经克隆测序表明,所扩增序列与 *VP*1 基因序列一致,为 774 bp。经 Blast 比对发现,克隆的 *VP*1 基因与 HiPV 日本分离物相应基因(GenBank 登录号: AB017037)核苷酸序列一致性为 96.3%,氨基酸序列一致性为 97.3%,说明了该病毒 *VP*1 基因序列变异性较小。

2.2 VP1 融合蛋白的原核表达和纯化

将 *VP*1 基因克隆到原核表达载体 pET-32a 中,获得重组载体 pET-*VP*1。测序验证后,重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3) pLysS 中,IPTG 诱导表达后,进行 12.5% SDS-PAGE 电泳分析。结果显示,与对照相比,含重组质粒的菌株出现明显的特异条带(图 2: A),大小为 47.5 kD,与预期大小相符合。经 6×His 单抗进行 Western blot 检测发现,表达的蛋白与 6×His 抗体发生特异性反应(图 2: C),表明 *VP*1 基因在大肠杆菌中得到了融合表达。利用 Ni^{2+}-NTA Agarose 对表达产物在变性条件下进行纯化,电泳分析显示,在 47.5 kD 处有一条高浓度的特异条带(图 2: B),无杂带,表明 VP1 蛋白被成功纯化。

2.3 多克隆抗体的效价和特异性

纯化的 VP1 蛋白经透析复性后,免疫新西兰大白兔制备了多克隆抗体。抗原稀释至 50 μg/mL 包被,以免疫前的兔血清为阴性对照,倍比稀释抗血清进行间接 ELISA 检测抗血清效价,结果显示,当抗体稀释 819 200 倍时,仍可表现出阳性反应,表明制备的抗血清效价很高,达 1∶819 200(图 3)。提取灰飞虱总蛋白,经 12.5% SDS-PAGE 电泳后,用抗血清进行 Western blot 检测,抗体稀释浓度为 1∶80 000,结果显示,多克隆抗体能与感染 HiPV 灰飞虱蛋白提取液中一条约 28.5 kD 蛋白条带(即 HiPV VP1 蛋白)发生特异性反应(图 4: A),符合理论值大小,且无其他杂带, 抗体在未感染 HiPV 灰飞虱总蛋白

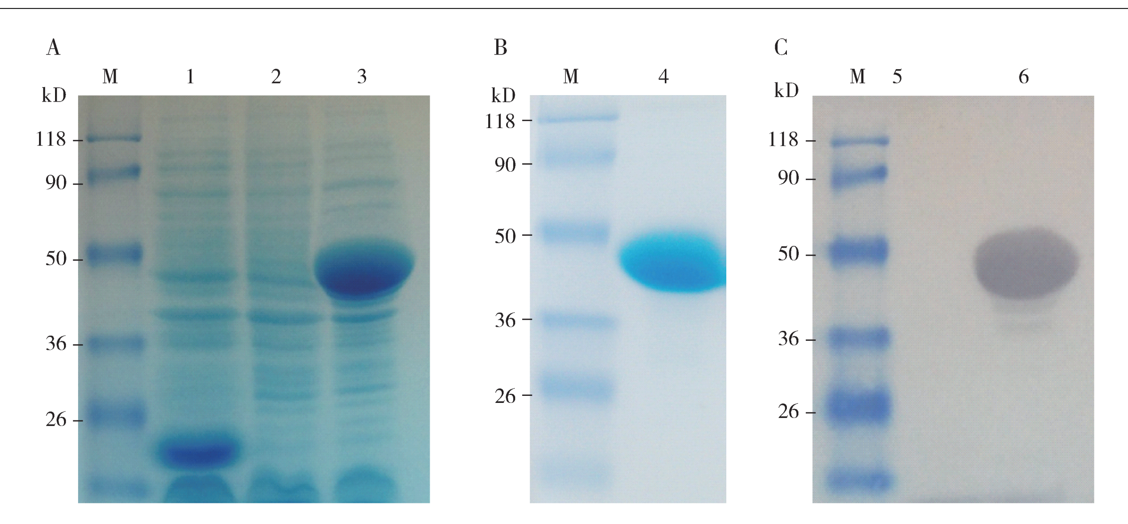


图 2　*VP*1 基因表达产物(A)和纯化蛋白(B)的 SDS-PAGE 分析及表达产物 Western blot 分析(C)

Fig. 2　SDS-PAGE of the expression products (A) and purified protein (B) and Western blot analysis (C) of the expression products of *VP*1 gene

M：蛋白分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：IPTG 诱导的含 pET-32a 空载体的大肠杆菌菌株 *Escherichia coli* with pET-32a vector induced by IPTG；2，5：未诱导的含 pET-*VP*1 的大肠杆菌菌株 Non-induced *E. coli* with pET-*VP*1 strain；3，6：IPTG 诱导的含 pET-*VP*1 的大肠杆菌菌株 *E. coli* with pET-*VP*1 induced by IPTG；4：纯化的 VP1 融合蛋白 Purified VP1 fusion protein.

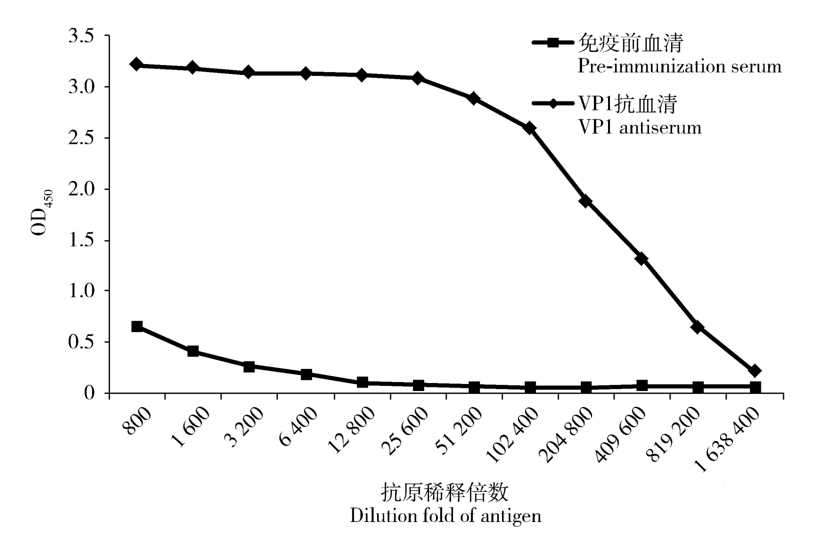


图 3　ELISA 检测的 VP1 多克隆抗体效价

Fig. 3　Titers of polyclonal antibody against VP1 by ELISA assay

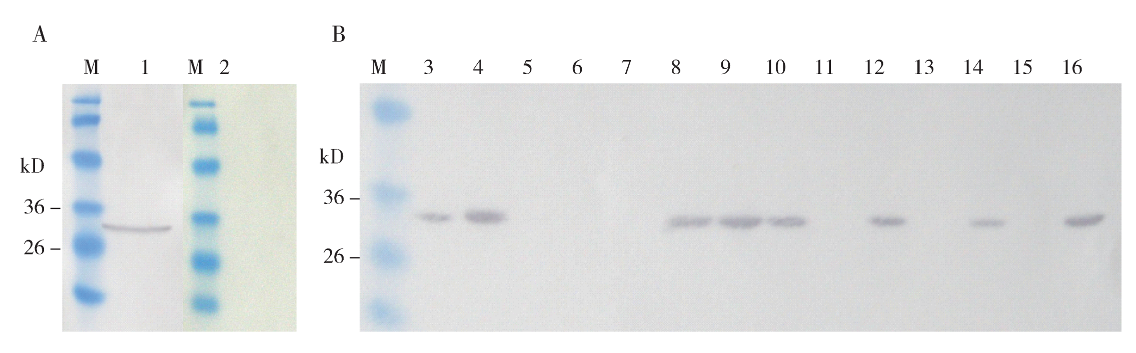


图 4　灰飞虱体内 HiPV 的 Western blot 检测

Fig. 4　Western blot detection of HiPV in *Laodelphax striatellus*

A：VP1 多克隆抗体特异性评价 Specificity evaluation of VP1 polyclonal antibody；B：单头灰飞虱成虫体内 HiPV 的检测 Detection of HiPV in the single adult of SBPH. M：蛋白分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：感染 HiPV 灰飞虱总蛋白 Total protein from HiPV-infected SBPH；2：未感染 HiPV 灰飞虱总蛋白 Total protein from HiPV-uninfected SBPH；3 – 16：单头灰飞虱成虫样本 Single adult sample of SBPH.

中没有检测出条带，说明多抗血清与灰飞虱其他蛋白无交叉反应。以上结果表明制备的多克隆抗体效价高、特异性强，可以用于灰飞虱体内 HiPV 的特异检测。

2.4 Western blot 检测单头灰飞虱成虫体内 HiPV

提取本实验室筛选的高亲和性灰飞虱群体中单头成虫的总蛋白，SDS-PAGE 电泳后，用 VP1 多抗进行 Western blot 检测，结果显示，Western blot 方法可以特异地从单头灰飞虱体内检测到 HiPV（图 4：B）。利用建立的 HiPV 检测方法，检测实验室筛选的携带和不携带 RSV 的灰飞虱高亲和性群体中 HiPV 的感染率，两个群体各随机抽取 80 头灰飞虱成虫进行检测。结果显示，带毒（RSV）和无毒灰飞虱群体中 HiPV 感染率相近，为 50% ~60%，表明 HiPV 在灰飞虱高亲和性群体内广泛存在，同时也说明 HiPV 感染灰飞虱不受是否携带 RSV 影响。

2.5 IC-RT-PCR 检测单头灰飞虱成虫体内 HiPV 方法的建立

利用制备的 HiPV VP1 多克隆抗体建立检测 HiPV 的 IC-RT-PCR 方法，结果显示，该方法可以从阳性样品中特异性地扩增到 774 bp 的条带（图 5），与预期条带大小一致，未感染 HiPV 的阴性样品没有扩增到条带，使用免疫前血清进行 IC-RT-PCR 也不能扩增到条带。扩增的 774 bp 条带经测序表明所扩增的 DNA 片段确为 HiPV 外壳蛋白 VP1 基因，说明建立的 IC-RT-PCR 检测方法具有良好的特异性。此方法无需提取昆虫 RNA，可用于 HiPV 的快速检测。

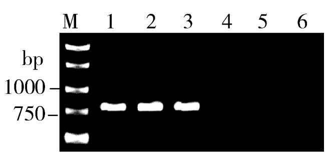


图 5 IC-RT-PCR 方法检测单头灰飞虱成虫体内 HiPV
Fig. 5 Detection of HiPV in single adult of *Laodelphax striatellus* by IC-RT-PCR method
M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker；1 -3：感染 HiPV 的单头灰飞虱成虫样本 HiPV-infected single SBPH adult sample；4：未感染 HiPV 的灰飞虱成虫样本 HiPV-uninfected SBPH adult sample；5：空白对照（未加昆虫研磨液）Blank control (without insect homogenate)；6：免疫前血清 Pre-immunization serum.

3 讨论

先前作者利用酵母双杂交系统筛选灰飞虱体内 RSV 互作因子，发现 HiPV 的外壳蛋白 VP1 和 VP3 均与 RSV NCP 存在互作关系（Li *et al*., 2018）。利用制备的 VP1 抗体，本研究检测发现携带和不携带 RSV 的灰飞虱群体中 HiPV 感染率相近，这说明 RSV 不影响 HiPV 感染灰飞虱。但 HiPV 感染灰飞虱后可以促进 RSV 的增殖；定量 PCR 检测带毒（RSV）群体中单头灰飞虱体内 RSV-*NCP* 和 HiPV-*VP1* 的表达量，发现两者呈正相关关系，HiPV-*VP1* 表达量高的灰飞虱体内 RSV-*NCP* 积累量也高，暗示 VP1 可能会影响 RSV 的增殖。RNAi 干扰带毒（RSV）灰飞虱 *VP1* 表达后，发现 RSV-NCP 的积累量显著降低，证明 VP1 可促进 RSV 在灰飞虱体内的积累；干扰无毒（RSV）灰飞虱体内 *VP1* 后，进行饲毒 RSV 实验，发现对灰飞虱获毒能力无显著影响（Li *et al*., 2015）。然而，HiPV 如何与 RSV 互作调控 RSV 增殖仍不清楚，有待进一步研究。本研究制备了高效价、高特异性 HiPV 的 VP1 多克隆抗体，并以此建立了检测单头灰飞虱体内 HiPV 的 Western blot 方法和 IC-RT-PCR 方法，其中，IC-RT-PCR 方法无需提取昆虫 RNA，可用于 HiPV 的快速检测。这为进一步研究 VP1 蛋白功能及 HiPV-RSV 互作和 HiPV-灰飞虱互作打下了基础。

Dot-ELISA 方法在大规模检测田间灰飞虱带毒（RSV）率中发挥了重要作用（周益军等，2012），在建立灰飞虱 HiPV 检测方法时，我们也利用 VP1 多抗血清尝试了该方法，但未获得成功。我们分析原因可能是 HiPV 在灰飞虱体内的含量与 RSV 相比低很多，Dot-ELISA 方法是从 50 ~100 μL 虫体匀浆液取样 2 μL 检测，这样 HiPV 被稀释无法检测到，同等稀释倍数下，RSV 则很容易被检测到，而 Western blot 检测是将单头灰飞虱总蛋白（溶于 10 μL 尿素）全部上样，这样 HiPV 粒子浓度增加，故可以检测到。

HiPV 为正单链 RNA 病毒，病毒结构简单，致病性弱（Guy *et al*., 1992；Nakashima *et al*., 1999），该特性使其具有改造为侵染性昆虫病毒载体的潜力。在本研究中，我们发现 VP1 蛋白在大肠杆菌中的表达量高于一般蛋白的表达量，说明 VP1 蛋白亲水性极强，且对宿主的毒性不大，改造过程中可以考虑利用 VP1 的亲水性结构域，增加目的蛋白的表达。VP1 蛋白分子量不大，后续可以分析确定其强亲水性结构域，在原核表达系统的载体改造中加以利用，以满足某些难以常规表达的蛋白的研究需要。本文制备的 VP1 多抗也可以为上述研究提供支持。

参考文献（References）

Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z, 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog*., 6(4): e1000833.

Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA, 2016. *Wolbachia* blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Microbe*, 19(6): 771-774.

Fang S, Yu J, Feng J, Han C, Li D, Liu Y, 2001. Identification of rice black-streaked dwarf fijivirus in maize with rough dwarf disease in China. *Arch. Virol*., 146(1): 167-170.

Gong ZX, Zheng QX, Peng H, Tsao TC, Eishiro S, 1985. Study on relationship between WRSV in China and NCMV in Japan. *Chin. J. Virol*., 1(3): 257-261. [龚祖埙，郑巧兮，彭海，曹天钦，四方英四郎，1985. 中国小麦丛矮病毒与日本北方禾谷花叶病毒相关性的研究. 病毒学报，1(3): 257-261]

Guy PL, Toriyama S, Fuji S, 1992. Occurrence of a picorna-like virus in planthopper species and its transmission in *Laodelphax striatellus*. *J. Invertebr. Pathol*., 59(2): 161-164.

Jia D, Mao Q, Chen Y, Liu Y, Chen Q, Wu W, Zhang X, Chen H, Li Y, Wei T, 2017. Insect symbiotic bacteria harbour viral pathogens for transovarial transmission. *Nat. Microbiol*., 2(5): 17025.

Jiang JX, Chen ZX, Zhou XP, 2003. Production of a monoclonal antibody to *Sugarcane mosaic virus* and its application for virus detection in China. *J. Phytopathol*., 151(6): 361-364.

Le WJ, Shi WQ, Ji YH, Zhou YJ, 2011. Relationship between *Wolbachia* and rice stripe virus infection in *Laodelphax striatellus*. *J. Nanjing Agric. Univ*., 34(1): 46-50. [乐文静，史文琦，季英华，周益军，2011. 灰飞虱体内 *Wolbachia* 的感染与其携带水稻条纹病毒的相关性分析. 南京农业大学学报，34(1): 46-50]

Li S, Ge S, Wang X, Sun L, Liu Z, Zhou Y, 2015. Facilitation of rice stripe virus accumulation in the insect vector by Himetobi P virus VP1. *Viruses*, 7(3): 1492-1504.

Li S, Li X, Zhou Y, 2018. Ribosomal protein L18 is an essential factor that promote *rice stripe virus* accumulation in small brown planthopper. *Virus Res*., 247: 15-20.

Li S, Zhou C, Chen G, Zhou Y, 2017. Bacterial microbiota in small brown planthopper populations with different rice viruses. *J. Basic Microbiol*., 57(7): 590-596.

Liu HJ, Cheng ZB, Wang Y, Wei BQ, Ren CM, Zhou YJ, Fan YJ, 2007. Preliminary study on transmission of rice stripe virus by small brown planthopper. *Jiangsu J. Agric. Sci*., 23(5): 492-494. [刘海建，程兆榜，王跃，魏邦庆，任春梅，周益军，范永坚，2007. 灰飞虱传递水稻条纹病毒研究初报. 江苏农业学报，23(5): 492-494]

Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, van den Heuvel JFJM, 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 256(1): 75-84.

Nakashima N, Sasaki J, Toriyama S, 1999. Determining the nucleotide sequence and capsid-coding region of Himetobi P virus: a member of a novel group of RNA viruses that infect insects. *Arch. Virol*., 144(10): 2051-2058.

Shang HL, Zhou XP, Wu JX, 2010. Polyclonal antibody-based dot-ELISA and immunocapture-RT-PCR for *Cucumber green mottle mosaic virus* detection. *J. Zhejiang Univ.* (*Agric. Life Sci.*), 36(5): 485-490. [尚海丽，周雪平，吴建祥，2010. 免疫斑点法和免疫捕获 RT-PCR 检测黄瓜绿斑驳花叶病毒. 浙江大学学报(农业与生命科学版)，36(5): 485-490]

Suzuki Y, Toriyama S, Matsuda I, Kojima M, 1993. Detection of a picorna-like virus, Himetobi P virus, in organs and tissues of *Laodelphax striatellus* by immunogold labeling and enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Invertebr. Pathol*., 62(1): 99-104.

van den Heuvel JFJM, Bruyère A, Hogenhout SA, Ziegler-Graff V, Brault V, Verbeek M, van den Wilk F, Richards K, 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol*., 71(10): 7258-7265.

Wei TY, Li Y, 2016. Rice reoviruses in insect vectors. *Annu. Rev. Phytopathol*., 54: 99-120.

Zhou YJ, Li S, Cheng ZB, Zhou T, Fan YJ, 2012. Research advances in rice stripe disease in China. *Jiangsu J. Agric. Sci*., 28(5): 1007-1015. [周益军，李硕，程兆榜，周彤，范永坚，2012. 中国水稻条纹叶枯病研究进展. 江苏农业学报，28(5): 1007-1015]

（责任编辑：马丽萍）